

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭57—39791

⑬ Int. Cl.³
C 12 P 13/00
#(C 12 P 13/00
C 12 R 1/645)

識別記号

庁内整理番号
6712—4B

⑭ 公開 昭和57年(1982)3月5日

発明の数 1
審査請求 未請求

(全 5 頁)

⑮ L-カルニチンの製造法

⑯ 特 願 昭56—98128

⑰ 出 願 昭56(1981)6月23日

優先権主張 ⑱ 1980年6月24日 ⑲ イタリア
(IT) ⑳ 86253A/80

㉑ 発 明 者 クラウジオ・カバツツア
イタリア共和国00144ローマ・

ビア・マロツコ35

㉒ 出 願 人 シグマ・タウ・インズストリエ
・ファルマチエウチケ・リウニ
テ・エツセ・ピ・ア
イタリア共和国00144ローマ・
ピアレ・シヤケスベアレ47

㉓ 代 理 人 弁理士 朝日奈宗太

明 細 書

1 発明の名称

L-カルニチンの製造法

2 特許請求の範囲

1 ニューロスボラ・クラツサの胞子より放出
される物質からなる相に、

(a) γ-ブチロベタイン、

(b) 2-オキシグルタル酸ナトリウム、

(c) 還元剤および

(d) 第一鉄イオン源

を水溶液供与性溶媒に溶かした溶液を接触さ
せることを特徴とするL-カルニチンの製造
法。

2 前記溶液が、(a)カタラーゼを含有してなる
特許請求の範囲第1項記載の製造法。

3 前記溶媒が水、緩衝溶液、炭素原子数1〜
4個を有する低級脂肪族アルコールおよびそ
れらの混合物よりなる群から選ばれた溶媒で

ある特許請求の範囲第1項記載の製造法。

4 前記還元剤が亜ニチオン酢アルカリ金属塩、
アスコルビン酸およびそのアルカリ金属塩よ
りなる群から選ばれた還元剤である特許請求
の範囲第1項記載の製造法。

5 前記第一鉄イオン源が硫酸第一鉄、硫酸第
一鉄アンモニウムおよびチオシアン酸第一鉄
よりなる群から選ばれた第一鉄塩である特許
請求の範囲第1項記載の製造法。

6 前記ニューロスボラ・クラツサが ATCC
13837、ATCC 24914、ATCC 9279および ATCC
15514 よりなる群から選ばれた菌株である特
許請求の範囲第1項記載の製造法。

7 前記相がニューロスボラ・クラツサの胞子
を洗浄剤で処理せしめることによりつくられ
る特許請求の範囲第1項記載の製造法。

8 前記洗浄剤がトライトン X-100 である特
許請求の範囲第7項記載の製造法。

9 前記相がニューロスボラ・クラツサの胞子
を超音波崩壊器で機械的に処理することによ

りつくられる特許請求の範囲第1項記載の製造法。

5 発明の詳細な説明

本発明は、L-カルニチンの製造法に関する。さらに詳しくは、本発明はγ-ブチロベタインにヒドロキシラーゼを反応させることによりL-カルニチンを酵素反応的に製造する方法に関する。

カルニチン(β-ヒドロキシ-γ-トリメチル-アミノ酸)が不飽和中心を有し、それゆえカルニチンにはD体およびL体の2種類の立体異性体が存在することはよく知られている。

L-カルニチンは通常生体内に存在し、活性化した長鎖のフリー脂肪酸をミトコンドリアの膜から通過させるキャリアーとしての働きを有する。ミトコンドリアの膜はアシル CoA 誘導体または長鎖脂肪酸などを通過させないが、これらがL-カルニチンでエステル化されると膜を通過できるようになる。すなわちL-カルニ

チンは、活性長鎖脂肪酸をそれが生合成された部位(たとえばミクロソーム)からそれが酸化される部位であるミトコンドリアへ移送する働きおよびその酸化によつて生成したアセチル CoA をミトコンドリアからその外側(そこで長鎖脂肪酸が合成される)へ移送させる働き、2つのキャリアーとしての機能を有する。なおミクロソームにおいてアセチル CoA はコレステロールおよび脂質を合成するために使われる。

カルニチンは左旋性の異性体(L-カルニチン)のみが天然物の形態(実際、ホ乳類の組織に関するかぎりD-カルニチンは検出されていない)であるにもかかわらず、D体およびL体の混合物(ラセミ体)のカルニチンが長年にわたり種々の症候に対して用いられてきた。たとえばヨーロッパにおいてはカルニチンのラセミ体は食欲増進剤に製剤されて販売されており、またそれが子供の成長の速度を促進する効果を有することが報告されている(たとえばボルニケ(Borniche)らの論文(Clinic Chemica Acta, 5、

171~176(1960))およびアレクサンダー(Alexander)らの1958年ブルジュエにおける第6回「体液中におけるタンパク質」に関する討論会要旨集306~310頁("Protides in the Biological Fluids", 6th Colloquium, Bruges, 1958, 306~310)参照)。また米国特許第3830931号明細書にはカルニチンのラセミ体の投与によつてしばしば心筋症の収縮性やうつ血症の心臓疾患における心筋収縮の律動性が改善されることが開示されている。さらに米国特許第3810994号明細書には肥満症の治療に対してカルニチンのラセミ体が効果を有することが開示されている。

しかし最近、少なくともいくつかの治療学的使用に対しては左旋性の異性体であるL-カルニチンのみを使用の方が効果的であることが次第に明らかにされ、その重要性に対する関心が高まりつつある。実際、D-カルニチンはカルニチン-アセチル-トランスフアラゼ(CAT)やカルニチン-パルミチル-トランスフアラゼ(PTC)などのカルニチン結合酵素(carnitine

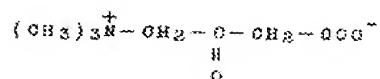
-linked enzyme)に対する競争的抗動質(competitive inhibitor)であることが明らかにされてきている。さらには、D-カルニチンが心臓組織におけるL-カルニチンの濃度を不足させるという報告も最近なされている。したがって心臓症や諸の血症に対する薬物的治療に際しては、カルニチンのL体のみを患者に投与するのが本来である。

カルニチンを工業的スケールで製造するための製造方法が数多く提案されてきた。カルニチンを化学的な合成法によつて製造したばあい、カルニチンはD体およびL体のラセミ混合物としてののみうるということが可能である。したがってL-カルニチンをうるためにはラセミ体を光学分離しなければならない。

その光学分離の方法のなかでも代表的なものはベルギー特許第660039号明細書に開示されているD,L-カルニチンアミド塩酸塩を出発物質として用いる方法である。その方法はD,L-カルニチンアミド塩酸塩にD-シヨウノウ酸(D-camphoric acid)を作用させて相当するD-シ

ヨウノウ酸エステルとしたのち、アルコールを溶媒として用いて分別結晶せしめ、最初に沈殿してくる固体から固体をうる ことになつてゐる。

この方法では、D,L-カルニチンアミドのD-シヨウノウ酸エステルを形成せしめるためにD-シヨウノウ酸はアンモニアを用いて相当するアンモニウム塩に変換したのち、生成したD-シヨウノウ酸のアンモニウム塩をつぎに硝酸銀を加えることによつてD-シヨウノウ酸の銀塩に変換させる必要がある。カルニチンアミドは塩酸塩の形になつてゐるので、D-シヨウノウ酸の銀塩と反応させればあいその塩素イオンは硝酸銀となつて沈殿するため大部分を除去できる。したがつてこの方法は銀化合物の使用が必要であるため非常に高価であり、また工業的スケールで行なうばあい生成した多量の硝酸銀により反応液がいちじるしく暗色化されることを避けるためにほとんどの製造工程が露光下で行なわれなければならないという欠点がある。



で表わされるデヒドロカルニチンを不整還元することを特徴としている。なお、カルニチン脱水素酵素はシュードモナス菌のバクテリアから単離される。

製薬学上の見地からは、この製造法はバクテリアを利用した種々の製造法と同様ないくつかの欠点がある。それらの欠点をつぎにあげる。

- (1) 該方法の酵素源は高価であり、複雑な精製工程によつて注意深く精製して用いなければならず、とくに工業的スケールで精製を行なうばあいにはその欠点が顕著になる。
- (2) 製造されるL-カルニチンも同様に十分な精製が必要であり、毒性を有し非衛生的なバクテリアの代謝産物やその他の汚染物から分離しなければならない。
- (3) NADH(高価な反応体)がバクテリア細胞膜を通過しないので無傷のバクテリアを用いたばあい、NADHは反応を活性化することができない。

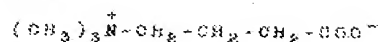
それに加えて、D,L-カルニチンアミドのD-シヨウノウ酸エステルが銀イオンによつて汚染されてしまうという欠点がある。さらには、アルコール溶媒から分別結晶によつてL-カルニチンアミドのD-シヨウノウ酸エステルをえたのち、最終的にL-カルニチンに変換するまでに数工程を要する。

ごく最近のフランス特許出願第7722183号明細書にL-カルニチンのみを選択的に合成する方法が開示されている。その方法は、

- (a) カルニチン脱水素化酵素(カルニチンデヒドロゲナーゼ)、
- (b) たとえばニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD)などに代表される脱水素化酵素の還元を使用される補酵素および
- (c) 酸化型であるNADをその還元型、すなわちNADHに還元するのに好適な化学的または酵素学的な試薬を用いて、式：

本発明者は反応に用いる酵素源としてバクテリア以外のものを用いてL-カルニチンを選択的に製造する方法を提供すべく鋭意研究を重ねた結果、ヒドロキシラーゼ酵素を有するニューロスボラ、クラツサ(*Neurospora crassa*)の胞子が水酸基供与性の溶媒中2-オキソグルタル酸ナトリウム、第一鉄イオンおよび還元剤の存在下でγ-ブチロベタインと接触したばあい、γ-ブチロベタインがほとんど純粋なL-カルニチンのみに選択的に変換されることを見出し、本発明を完成するにいたつた。

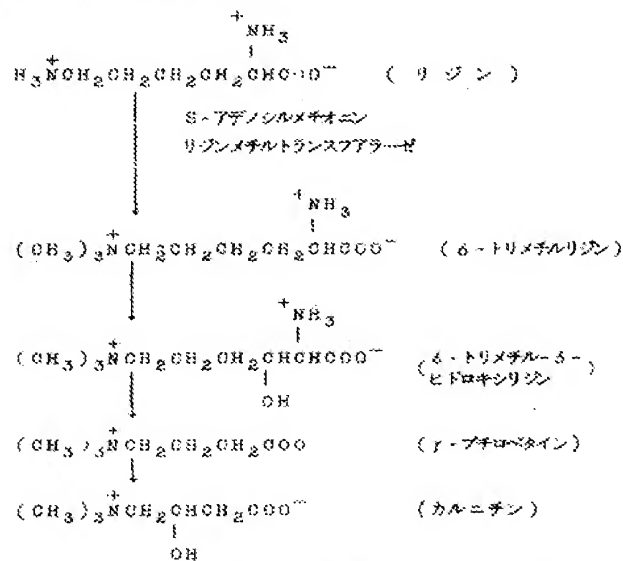
式：



で表わされるγ-ブチロベタインは公知物質であり、化学的な合成法によつてたやすく調製することができる(γ-ブチロベタインの製造法は、たとえば *Can. J. Chem.*, 54, 3310-3311, (1976)を参照)。

生体中においてγ-ブチロベタインがL-カルニチンにヒドロキシル化されることは知られ

ている。実際、ここ2～3年の研究によつて、カルニチンがつぎの機構にしたがつて生合成されることが明確にされてきている。



またラットの肝臓から単離され、部分的に精製された溶解性タンパクのフラクションによつて γ -ブチロベタインが δ -カルニチンにヒドロキシル化されることも報告されている。

かまたは胞子を超音波崩壊などで機械的に処理することによつてえられる。

δ -カルニチンの収率をさらに向上させるために前記溶液に(c)カタラーゼを加えることもできる。

γ -ブチロベタイン、2-オキソグルタル酸ナトリウム、還元剤およびヒドロキシル化の触媒を溶解させるための溶媒は水、緩衝液、炭素原子数1～4個を有する低級アルコールおよびそれらの混合物よりなる群から選ばれるが、なかんづくpH7のリン酸カリウム緩衝液が好ましい。

本発明に用いる還元剤は第二鉄イオン(Fe^{2+})を第一鉄イオン(Fe^{3+})に還元するのに好適な各種の還元剤が用いられる。第一鉄イオンはニューロスボラ・クラツサの胞子中に含まれているヒドロキシラーゼ酵素による γ -ブチロベタインのヒドロキシル化反応の触媒として働く。したがつて第二鉄イオンが生合成しても、そのものはただちに第一鉄イオンに変換される。これらの還元剤はとくに限定されないが、好ましくは

(Biochemistry, 6, 51, 1271～1282 (1967) 参照)。

しかしながら、ニューロスボラ・クラツサの胞子中に γ -ブチロベタインのヒドロキシラーゼ酵素が存在し、その胞子を物理化学的に(chemico-physically)または機械的に処理することによつてその構造が一部変化したヒドロキシラーゼが放出され、それが γ -ブチロベタインの変換に用いられることは知られていない。

本発明は γ -ブチロベタインにヒドロキシラーゼ酵素を反応させることによる δ -カルニチンの製造法、さらに詳しくは、ニューロスボラ・クラツサの胞子から放出された物質からなる相に(a) γ -ブチロベタイン、(b)2-オキソグルタル酸ナトリウム、(c)還元剤および(d)ヒドロキシル化の触媒源である第一鉄イオンの水溶液供与性溶媒の溶液を接触させる工程からなることを特徴とする δ -カルニチンの製造法を提供することを目的とする。

相に含まれる胞子から放出される物質は胞子を洗浄剤(detergent)で物理化学的に処理する

アルカリ金属の重二チオン酸塩、アスコルビン酸またはその金属塩などがあげられる。

第一鉄イオン源としてはヒドロキシラーゼ酵素の活性を失活しないようなアニオン部を有する水溶性の鉄塩が用いられうる。好ましい第一鉄源としては硫酸第一鉄(FeSO_4)、硫酸第一鉄アンモニウム($(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$)またはチオンアンモニウム第一鉄($\text{Fe}(\text{SCN})_2$)などの第一鉄塩があげられるが、なかんづく硫酸第一鉄が好ましい。

あらゆる菌株のニューロスボラ・クラツサの胞子が本発明に用いられるが、とくにATCC9279、ATCC13837、ATCC15514またはATCC24924の菌株が本発明には好ましい。ニューロスボラ・クラツサの胞子の増殖、単離および精製は微生物学のごく普通の専門家が有する一般的な技術によつて簡便に行ないうるが、好ましくは、エム・コルタット(M. Cortat)らの論文("Cormidiation of Neurospora Crassa in Submerged Culture without Mycelial Phase", Arch. Microbiol., 95, 305～309 (1974) 参照)に開示されている

方法にしたがうのがよい。

かくして増殖し、単離された胞子はその酵素活性を失なったりまたはほとんど減少してしまったりすることなしに保存される。胞子はトライトン X-100 (Triton X-100) などの洗剤で処理するかまたは超音波崩壊器などの機械的方法によつて処理される。この処理によりヒドロキシラーゼ酵素が放出され、そのものからヒドロキシラーゼ酵素を含有する相がえられる。該相は処理された胞子の残遺物を含有した状態または含有していない状態で本発明に用いられる。

つぎに実施例をあげて本発明を説明するが、本発明はかかる実施例のみに限定されるものではない。

実施例

5 ~ 30 pモル/ml の酵素濃度に調整した胞子処理物質含有相、 γ -ブチロベタイン 2 ~ 14mmol/l、硫酸第一鉄アンモニウム 0.6 ~ 2mmol/l、アスコルビン酸ナトリウム 10 ~ 14mmol/l、2-オキソグル酸ナトリウム 1.4 ~ 3mmol/l およびカタラー

ゼをリン酸カリウム 14mmol/l の緩衝液 (pH7) にその濃度が 1 ~ 1.4g/l となるように加えて調製した溶液を反応容器に添加した。この混合物を 37°C で 30 ~ 60 分間培養したのち、反応液を 0.7 ミリポアのフィルターでろ過した。

溶液中の L-カルニチンはデビッド・ジェイ・ピアソン (David J. Pearson) らの方法で分析した ("Method of Enzymatic Analysis", 第 4 巻 (第 2 版)、1974 年、1758 頁、Academic Press Inc. 参照)。その分析値から L-カルニチンが約 80% の収率で生成していることがわかった。

この溶液を常法により処理してえられる有機物残遺は未反応の γ -ブチロベタインおよび L-カルニチンの混合物であつた。該混合物はゲラン・リントシュナット (Göran Lindstedt) が開示している方法 (Biochemistry, 4, (5), 1271 ~ 1281 (1967) 参照) によつて処理し L-カルニチンを単離した。

えられた L-カルニチンは生体系から抽出される L-カルニチンと同じ光学的性質を示した。

本発明の方法は、従来なされてきた方法にくらべていくつかの点ですぐれている。それらの長所を以下にあげる。

- (1) 従来の化学的な方法ではカルニチンは D 体および L 体のラセミ混合物としてえられるのに対し、本発明の方法によれば L-カルニチンのみを選択的にかつ高収率 (約 80%) でうるることができる。そのためラセミ混合物を左旋性と右旋性の物質に光学分離し、ついで後者を再びラセミ化し、さらに光学分離に供する必要がない。
- (2) 従来のバクテリアを酵素源として用いる方法にくらべて、本発明の方法は使用する酵素源ならびに生成した L-カルニチンを精製するときのわずらわしさがなく、しかも安価である。またヒドロキシラーゼ酵素を胞子処理物から単離する必要がなく、安全に操作が行ないえ、えられる L-カルニチンはほとんど純粋な結晶である。いいかえれば、従来のバクテリアを使用する方法において不可欠であ

つたバクテリアおよびバクテリア代謝産物などの汚染物質を L-カルニチンから除去する必要がない。

- (3) ニューロスボラ・クラツサの胞子は大量に製造することができ、しかも乾燥した形で保存できる。さらにそれらは、ほとんどその酵素活性を失なうことなく必要なときに取り出して用いることができる。

特許出願人 シグマ・タウ・インズトリエ・ファルマチエ
ウチネ・リウニテ・エッセ・ピ・ア

代理人 弁護士 朝 日 奈 宗 太